



(19) RU (11) (21) 94016167 (13) A1

(51) 6 A 61 K 9/16, 9/22

Комитет Российской Федерации  
по патентам и товарным знакам

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЗАЯВКЕ

1

- (21) 94016167/14 (22) 21.01.94  
(31) РК 7398  
(32) 24.07.91  
(33) AU  
(43) 10.04.96 Бюл. № 10  
(86) РСТ/  
(72) Томас Сай Йинг Ко(AU)  
(71) Энзакор Пропертиз Лимитед (GB)  
(74) Матвеева Н.А.  
(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СПОСОБЫ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА, СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ, СПОСОБЫ СТИМУЛИРОВАНИЯ  
(57) Описаны композиции, включающие в себя гранулы, которые содержат биологически активное вещество в сочетании со слабым основанием и частично покрыты материалом пролонгированного высвобождения, растворимым в кишечном соке, подкисляющий агент,

2

имеющий pH 1,5 - 6, гелеобразующий агент. Также описана композиция, состоящая из подкисленного геля, имеющего pH 1,5 - 6 и содержащего микрогранулы, которые включают в себя биологически активное вещество в сочетании со слабым основанием и являются частично покрытыми материалом пролонгированного высвобождения, растворимым в кишечном соке. Указанные композиции могут быть использованы для лечения заболеваний, ассоциированных с кишечными патогенами у животных. Если оказанным биологически активным веществом является протеаза, то находящиеся в тонком кишечнике рецептор-сайты связывания для патогенов могут быть расщеплены этой протеазой, что способствует предупреждению связывания патогена с поверхностью тонкой кишки.

AI

94016167

RU

RU

94016167

AI

9 - OKT 1993

4016167 - 1993

Настоящее изобретение относится к новым композициям, к способам доставки биологически активных веществ в кишечник и к способам лечения животных от поражения кишечными патогенами. Тонкий кишечник животных играет важную роль в абсорбции биологически активных материалов, таких, как компоненты переваренной пищи, антибиотики, витамины и т.п. Биологически активные материалы часто оказываются неустойчивыми к воздействию кислот, а поэтому могут разлагаться или инактивироваться при прохождении через желудок на пути к тонкому кишечнику, где они должны абсорбироваться или оказывать свое биологическое действие.

Ранее предполагалось, что материалы, используемые для энтеросолюбильных покрытий и содержащие кислотостойкие растворимые в щелочи вещества, такие, как ацетифталат целлюлозы, предохраняют биологические вещества от разложения при их прохождении через желудок, способствуя тем самым последующему их высвобождению в кишечнике. У молодых животных, например у поросят, прохождение материалов с энтеросолюбильным покрытием через кишечник происходит настолько быстро, что это энтеросолюбильное покрытие не успевает разрушиться, что приводит к экскреции материалов с энтеросолюбильным покрытием, либо к высвобождению биологически активных веществ в неподходящих областях кишечника, например в толстой кишке.

Кроме того, биологически активный материал, такой как протеазы, может быть неприятным на вкус и вызывать раздражение и воспаление ротовой полости, а также эзофагит.

Поэтому необходимо, чтобы новые композиции и методы способствовали бы эффективной и приемлемой доставке биологически активного вещества в области тонкого кишечника животных.

В соответствии с одним из своих вариантов настоящее изобретение относится к композиции, которая включает в себя: (I) гранулы, содержащие биологически активное вещество в сочетании со слабым основанием и частично покрытые растворимым материалом с пролонгированным высвобождением в кишечном соке; (II) подкисляющий агент, имеющий рН в растворе от 1,5 до 6; и (III) гелеобразующий агент.

В соответствии с другим своим вариантом, настоящее изобретение относится к композиции, которая включает в себя подкисленный гель, имеющий рН около 1,5 до около 6, и микрогранулы, содержащие

белок в сочетании со слабой кислотой и частично покрытые растворимым материалом, обеспечивающим замедленное высвобождение активного вещества в кишечном соке.

Биологически активным веществом может быть белок, такой, как фермент, фактор роста, цитокин, или гормон. Если используемый фермент является протеолитическим ферментом, то такой фермент предпочтительно выбирать из бромелина, папаина, фицина, химотрипсина, трипсина, рибонуклеазы, карбоксипептидазы А или В, или субтилизина. Из них наиболее предпочтительным является бромелин. Факторами роста являются гормоны, инсулин, и т.п.

В соответствии с настоящим изобретением, под термином "белок" также подразумеваются пептиды. Обычно пептид включает в себя от 2 до 100 аминокислот, тогда как белок содержит 100 или более аминокислот.

Биологически активными веществами могут быть вещества небелкового происхождения, например витамины, кофакторы, ионы металлов, антибиотики и т.п. Биологически активные вещества могут быть получены в виде микрочастиц, например в виде порошка.

Термин "слабое основание" означает подщелачивающий агент такой, как дикальцийфосфат, карбонат кальция, бикарбонат кальция, гидроксид алюминия, бикарбонат натрия и т.п. Предпочтительно, если указанное слабое основание является умеренно растворимым. Слабое основание обычно используют в виде микрочастиц, способных растворяться в соответствующей среде, такой, как желудочный сок. Если слабое основание и биологически активное вещество используются в виде микрочастиц, то перед покрытием, они могут быть смешаны друг с другом.

Гранулы могут быть получены путем частичного покрытия смеси, состоящей из микрочастиц биологически активных веществ и буферных агентов, материалом пролонгированного высвобождения (известного под названием "энтеросолюбильное покрытие"), растворимым в кишечном соке. Флюидизированные частицы могут быть покрыты раствором из материала пролонгированного высвобождения путем напыления. Размер гранул, полученных в результате покрытия флюидизированных частиц в псевдоожиженном слое путем распыления, может регулироваться и зависит от скорости потока частиц и от давления, под которым подается раствор для покрытия при распылении. Например, быстрый поток гранул и высокое давление распыления приводят к образованию мелких

гранул. В основном диаметр гранул составляет от 50 до 500 микрон, однако указанный диапазон не должен рассматриваться как ограничение объема настоящего изобретения. Такие гранулы называются микрогранулами.

В соответствии с настоящим изобретением гранулы могут лишь частично покрыты материалом пролонгированного высвобождения. Это является очень важным аспектом настоящего изобретения, поскольку в этом случае предусматривается быстрое высвобождение биологически активного вещества в кишечник. Такое частичное покрытие может быть, в основном, осуществлено путем покрытия распылением псевдооживленного материала. Степень покрытия может быть определена с помощью микроскопического анализа гранул. В основном, материалом пролонгированного высвобождения может быть покрыто от 10 до 90% от всей поверхности гранул, а предпочтительно от 50 до 80% всей поверхности гранул.

Материалами пролонгированного высвобождения могут быть любые материалы, которые являются, в основном, непроницаемыми и сохраняют свою целостность при pH ниже 6,0, и которые разлагаются, растворяются, становятся проницаемыми, или теряют свою структурную целостность при щелочном pH, то есть при pH около 7,0 и выше. Примерами таких материалов являются ацетифталат целлюлозы или другие типы энтеросолюбильных покрытий.

Подкисляющие агенты могут быть использованы в виде микрочастиц, которые после их солюбилизации в растворе делают этот раствор кислым, то есть раствор с pH от около 1,5 до около 6; а предпочтительно от около 3,5 до около 6. Любой нетоксичный агент, удовлетворяющий вышеуказанным критериям, входит в объем настоящего изобретения. Примерами подкисляющих агентов являются лимонная кислота, молочная кислота, винная кислота, янтарная кислота, шавелевая кислота, фумаровая кислота, масляная кислота, соляная кислота, пропионовая кислота и т.п.

Гелеобразующие агенты также используются в основном в форме микрочастиц, которые способны образовывать гелевую матрицу в соответствующих условиях, например, в дисперсиях или смесях с водными или органическими растворами (такими, как глицерин или полиэтиленгликоль). Примерами гелеобразующих агентов являются карагинаны, альгинаты; поливинилпирролидон (PVP); метилметакрилат, замещенный растворимыми в желчи жирными кислотами; декстран и т.п. Подкисленный гель может

быть получен путем гидратации или диспергирования гелевой матрицы в кислотном растворе или в присутствии подкисляющего агента, описанного выше.

В одном из вариантов настоящего изобретения композицию получают в виде микрочастиц, представляющих собой смесь гранул с частицами подкисляющего агента и гелеобразующего агента. В этой форме композиция хорошо сохраняется и легко транспортируется. Перед использованием данной композиции в целях доставки биологически активного вещества в области тонкого кишечника животного, к этой композиции добавляют небольшое количество воды или другого нетоксичного раствора, в результате чего получают подкисленный гель, образующийся вследствие перехода гелеобразующего агента в гель в присутствии подкисляющего агента, микрогранулы которого содержатся в данной композиции. Эту процедуру осуществляют для получения подкисленной гелеобразной композиции, описанной в данной заявке.

Соотношения компонентов (I) - (III) -композиции настоящего изобретения в основном не являются критическими параметрами, однако это отношение может составлять, например, 10:1:1 (по массе). Аналогично отношение биологически активного вещества к буферному агенту не является критическим, но в основном оно может составлять, например, 1:4 (по массе).

Композиция настоящего изобретения может, кроме того, содержать один или несколько антибиотиков. Если в этом варианте настоящего изобретения, композиция изготавливается в гранулированной форме, то антибиотик может быть использован в виде порошка или гранул, которые смешивают с другими компонентами. Если, согласно этому варианту настоящего изобретения, композицию изготавливают в виде геля, то один или несколько антибиотиков обычно растворяют в процессе получения гелевой матрицы, в результате чего этот антибиотик (или антибиотики) распределяются по всей гелевой матрице.

В композиции настоящего изобретения могут быть использованы антибиотики любого класса, например, такие, как пенициллин, цефалоспорин, эритромицин, тетрациклин, тиенамицин, неомицин и другие соединения, включая производные, обладающие антибиотической активностью.

Как будет показано ниже, очевидно, что указанные антибиотики синергически взаимодействуют с композициями настоящего изобретения (в частности, с композициями, в

которых биологически активным материалом является протеаза), в случае, когда они вместе с указанными композициями используются для лечения кишечных бактериальных инфекций, ассоциированных с различными заболеваниями.

В еще одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к способу доставки биологически активного вещества в верхний отдел тонкого кишечника животного, заключающемуся во введении этому животному композиции, описанной выше. Если указанная композиция является гелеобразной, то ее непосредственно вводят животному. Если вышеописанная композиция используется в виде гранул, то в этом случае ее сначала диспергируют или смешивают с соответствующим раствором, в результате чего образуется гель, затем, уже в виде геля, вводят животному.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к способу обработки кишечных патогенов и/или лечения заболеваний, ассоциированных с инфекциями, вызываемыми кишечными патогенами у животных, который заключается в том, что животному перорально вводят терапевтически эффективное количество композиции, определенной выше. Предпочтительно, если указанная композиция содержит протеазу, например, бромелин, в сочетании (но необязательно) с одним или несколькими антибиотиками. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения один или несколько антибиотиков могут быть введены одновременно или почти одновременно.

Кишечными патогенами, которые могут быть подвергнуты обработке в соответствии с настоящим изобретением, являются бактерии, вирусы или паразиты, примерами таких патогенов могут служить энтеротоксигенные бактерии *Escherichia coli*, шигелла *Shigella*, *Yersinia*, *Pleisomonas*, вибрионы, *Aeromonas*, кампилобактер (*Campylobacter*), ротавирусы, криптоспоридии (*Cryptosporidia*), или кокцидии (*Cocci* *Losis*).

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения диареи у животных, заключающемуся во введении указанному животному композиции, включающей в себя подкисленный гель, имеющий рН от 1,5 до 6; причем указанный гель содержит микрогранулы, которые включают в себя протеолитический фермент в сочетании со слабой кислотой, и которые частично покрыты материалом пролонгированного высвобождения, растворимым в кишечном соке. Одна композиция может содержать, но

необязательно, один или несколько антибиотиков, либо указанные один или несколько антибиотиков могут быть введены одновременно или почти одновременно с композицией.

Способы настоящего изобретения могут быть использованы для лечения любого животного, предпочтительно млекопитающего, такого, как человек, свинья, крупный рогатый скот, лошади, овцы, а также птиц, рыб или ракообразные. В частности, предпочтительными животными являются моножелудочные животные, такие, как детеныши свиньи или человека, либо неполовозрелое жвачное животное, такое, как бычок.

Хотя в различных вариантах своего осуществления настоящее изобретение предпочтительно применяется к моножелудочным и неполовозрелым жвачным животным, однако оно может быть также применено и в водном хозяйстве для лечения кишечных заболеваний у рыб (и ракообразных), которые могут возникать и интенсивно распространяться, например, в прудах, водоемах и т.п. Действие композиций, содержащих протеазы, направлено на удаление участков адгезии патогенов в тонких кишках рыб и ракообразных, а также на повышение системного иммунитета.

Если композиции настоящего изобретения применяются для лечения человека, то они могут быть подмешаны к питью, например, к воде или буферному раствору, имеющему рН от около 4 до 7. Степень покрытия микрогранул, используемых для введения человеку, составляет около 20%.

В соответствии с настоящим изобретением, введение подкисленного геля может быть осуществлено любыми стандартными способами. Например, гель может быть влит или инъецирован в ротовую полость животного. Альтернативно указанный гель может быть нанесен на пищу, например, на корм животного, или смешан с ней.

Количество подкисленного геля, вводимого животному в целях добавки биологически активного вещества в области тонкого кишечника животного, или в целях лечения диареи, не является решающим фактором, как, впрочем, и частота введения, и зависит от многих факторов, таких, как вес и физическое состояние животного, его режим питания, условия обработки и другие факторы и может быть определено фермером, ветеринаром, или врачом. Например, поросят, в его ротовую полость может быть введено 1-5 мл подкисленного геля с помощью шприца. Аналогично эффективное количество композиции настоящего изобре-

тения может составлять от около 0,01 г/кг веса тела до около 5 г/кг веса тела.

Как было показано авторами настоящей заявки, эффективная доставка биологически активных протеаз в верхние отделы тонкого кишечника животного, обеспечиваемая композициями настоящего изобретения, приводит к деструкции (вероятно, путем протеолиза) кишечных мембранных рецепторов для патогенез (например, рецепторов для патогенной бактерии *E.coli* K88) и к деструкции рецепторов токсинов в кишечнике. Композиции настоящего изобретения, содержащие протеазу, способствуют ограничению естественной физиологии организма посредством использования пищеварительных ферментов, благодаря которым происходит временное удаление бактериальных и других рецепторов патогенов со слизистой оболочки тонкого кишечника животного. Без этих рецепторов патогенные организмы не могут образовывать колонии на поверхности выстилки кишки. Поэтому, не имея возможности образовывать большие колонии, патогенные микробы не способны вызвать заболевание. Такой уникальный способ предупреждения микробных инфекций, который осуществляют путем модификации хозяина, а не патогена, позволяет решить проблемы, связанные с применением традиционных антибиотиков, приводящим в конечном счете к появлению микробов, устойчивых к этим антибиотикам.

Кроме того, было неожиданно обнаружено, что композиции настоящего изобретения являются эффективными против патогенных микробов, которые не обладают известным адгезивным механизмом или рецептором (например, таких, как протозойные организмы), а также против вирусов, таких, как ротавирусы и вирусы инфекционного гастроэнтерита (TGE). Этот факт свидетельствует о том, что композиции настоящего изобретения, в частности композиции, содержащие протеазы (например, протеазы растительного и животного происхождения, такие, как бромометил, папани, фицин, химотрипсин, рибонуклеаза, субтилизин, карбопептидаза А или В и т.п.) могут действовать как неспецифические иммуностимуляторы. Это иммуностимулирующее действие композиций настоящего изобретения не совсем ясно. Хотя, если иммуностимулирующее действие может быть специфичным для конкретного патогена то, вероятно, оно может быть неспецифичным и просто способствовать усилению продуцирования IgG.

Использование композиции, содержащей протеазу, в сочетании с антибиотиками дает

синергическое действие при лечении кишечных микробных инфекций. Такой синергический эффект может возникать вследствие неспецифического действия композиции, направленного на повышение иммунного ответа с образованием антител, и тем самым благоприятствующего противомикробному действию антибиотиков. Также неожиданно было обнаружено, что вышеупомянутые композиции, содержащие протеазу и антибиотик, способствуют повышению системной абсорбции антибиотика из кишечника. Механизм, приводящий к такому эффекту, остается неясным. Указанный эффект наблюдается также при одновременном или почти одновременном введении антибиотиков и композиции настоящего изобретения, изготовленной в виде подкисленного геля.

Композиции настоящего изобретения, содержащие протеазу, также обладают широким спектром противопаразитарного действия у животных, способствуют увеличению веса и снижению смертности среди животных, в частности, неполовозрелых моножелудочных животных, таких, как поросята.

В соответствии с другим своим вариантом, настоящее изобретение относится к способу, который не относится к стимуляции иммунной системы животных и который предусматривает пероральное введение животному композиции, состоящей из подкисленного геля, имеющего pH от около 1,5 до около 6 и содержащего микрогранулы, включающие в себя биологически активное вещество, в частности протеазу, в сочетании со слабым основанием, и частично покрытые материалом пролонгированного высвобождения, растворимым в кишечном соке. Указанная протеаза может быть животного или растительного происхождения и может быть выбрана, например, из таких протеаз, как бромелин, папанин, фицин, химотрипсин, трипсин, рибонуклеаза, карбоксипептидаза А или В, или субтилизин и т.п.

Как будет показано в нижеприведенных примерах, композиции настоящего изобретения, содержащие протеазу, способствуют значительному снижению патогенной флоры кишечника. Это неожиданное явление предоставляет прекрасную возможность для повторного заселения кишечника животного предпочтительными непатогенными бактериями от здоровых животных, такими, как молочнокислые бактерии, стрептококки и т.п.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к способу, включающему в себя стадию перорального введения животному композиции, состоящей из подкисленного геля, имеющего pH от около 1,5

до около 6, и содержащего микрогранулы, которые включают в себя протеазу в сочетании со слабым основанием и которые частично покрыты материалом пролонгированного высвобождения, растворимым в кишечном соке; и последующую стадию перорального введения животному микроорганизмов, которые могут содержать один или несколько компонентов кишечной флоры здорового животного.

Организмы, вводимые животному в соответствии с вышеописанным вариантом настоящего изобретения, могут быть названы "пробиотиками" и введены одновременно с композицией подкисленного геля, либо немного позднее, то есть через промежуток времени, составляющий от нескольких минут до 24 часов.

Указанные пробиотики могут быть введены в лиофилизированной форме или в любой другой подходящей форме, например, в виде питательного раствора или суспензии микроорганизмов и т.п. В еще одном своем варианте настоящее изобретение относится к вышеописанной композиции в виде микрогранул или подкисленного геля, которую подмешивают к обычному корму животного, хорошо известному специалистам, например, такому, как гранулированный корм.

Отличительные особенности композиций настоящего изобретения и их преимущества обусловлены следующими факторами:

1. Получение гранул небольшого размера, а именно 50- 500 микрон (в результате чего они могут быть названы "микрогранулами"), способствует замедлению высвобождения материала в полости рта (защищая тем самым полость рта от воздействия протеаз, таких, как бромелин) и в желудке. Небольшой размер частичек облегчает также их прохождение через желудок.

2. Присутствие буферного агента внутри гранул, обеспечивающего pH в пределах от 3 до 6, способствует ингибированию протеолитической активности пепсина в желудке, нейтрализации желудочного pH, предохранению от инактивации чувствительного к воздействию кислоты биологического вещества, такого, как протеаза, и поддержанию оптимального pH биологического вещества, такого, как протеолитический фермент, например бромелин.

3. Частичное покрытие гранул материалом пролонгированного высвобождения защищает биологическое вещество от инактивации кислотой и способствует постепенному высвобождению биологического вещества в тонком кишечнике, начиная с двенадцатиперстной кишки, а также служит для

маскировки неприятного вкуса. Гранулы, полностью покрытые энтеросолюбильным покрытием, не могут высвобождать биологические вещества, особенно у молодых моножелудочных или жвачных животных, а поэтому эти вещества будут выводиться из организма, либо они будут высвобождаться в неподходящих участках кишечника. Неожиданно было обнаружено, что частичное покрытие гранул материалом пролонгированного высвобождения не вызывает инактивации биологически активных веществ в желудке. Этот факт можно, вероятно, объяснить присутствием буферного агента, описанного выше, в п.2.

4. Подкисляющий агент стимулирует у животного слюноотделение, повышает вкусовые качества композиции, а также снижает желудочный pH, что способствует сохранению целостности материала пролонгированного высвобождения в желудке.

5. Если используемая композиция имеет форму геля, то гелеобразующий агент способствует снижению диффузии вещества из гранул и поддерживает гранулы в легко текучей суспензии. Указанный гель также защищает слизистую оболочку щек, поскольку он ограничивает диффузию свободного фермента (или другого биологического вещества) из гранул. Благодаря присутствию в геле подкисляющего агента, у животного стимулируется слюноотделение и улучшаются вкусовые ощущения.

Нижеприведенные примеры осуществления настоящего изобретения приводятся лишь в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничение изобретения.

Пример 1. Получение композиций.

Были получены следующие композиции, содержащие протеолитический фермент бромелин:

(I) Гранула:

Бромелин	25% масс.
Дикальцийфосфат	69% масс.
Ацетофталат целлюлозы	10% масс.
Всего	100% масс.

(II) Подкисляющий агент:

Лимонная кислота	5% по массе гранулы
------------------	---------------------

(III) Гелеобразующий агент

Карбоксиметилцеллюлоза	10% по массе гранулы
------------------------	----------------------

Способ:

1.1 кг ацетофталата целлюлозы диспергировали в 10 литрах воды.

2. К раствору, полученному в стадии 1, добавляли достаточное количество карбоната натрия или гидроксида натрия, в результате

чего получали натрийсодержащий ацетофталат целлюлозы (натрий-АФЦ) приблизительно при pH 6,5.

3. Бромелин (2,6 кг) и дикальцийфосфат (6,5 кг) взвешивали и загружали в контейнер, находящийся в распылителе для нанесения покрытий GIAtt (торговая марка) или Aegomatic (торговая марка). Порошок флюидизировали и нагревали до 50°C.

4. На флюидизированный порошок распыляли натрий-АФЦ при давлении 2 бар, а после завершения покрытия материал оставляли для осушки на 30 минут.

5. Затем частично покрытый материал смешивали с лимонной кислотой (0,6 кг) и с карбоксиметилцеллюлозой (1кг), используя стандартный смеситель.

Способ покрытия флюидизированных частиц путем распыления является особенно подходящим для изготовления частично покрытых гранул. Для получения частичного покрытия в отношении (масс./масс.) биологически активного вещества/слабого основания к покрытию, в основном, составляет около 1:0,1 или 1:< 0,1.

В последующих примерах полученную гранулированную композицию обозначали "Detach".

"Дозу" в 5 мл Detach получали путем добавления воды (около 4 мл) к 1 г (объем приблизительно 1 мл) гранул с образованием геля объемом 5 мл.

Пример 2. Определение времени прохождения через кишечник бромелина, введенного в виде разовой дозы 5 мл "Detach", содержащей 1 г гранул, к которым добавляли воду для получения подкисленной гелевой основы.

Восемнадцать 4-недельных поросят, еще не отлученных от матери и примерно одной массы, были произвольно распределены на группы: "Detach" - обработанную группу и необработанную (контрольную) группу в отношении 2:1 (т.е. два поросенка обрабатываемой группы на одного поросенка контрольной группы). Поросятам давали искусственное молоко (500 мл каждому) два раза в день.

В самом начале эксперимента всем поросётам обрабатываемой группы перорально вводили стандартную 5 мл-дозу "Detach" (т.е. суспензии, содержащей 1 г гранул, растворенных в воде в целях получения кислой гелеобразной основы). Через 1 ч, 12 ч, 28 ч, 4 ч, 72 ч и 144 ч после инокуляции, произвольно отобранные группы из трех поросят (два обработанных поросенка и один контрольный) умерщвляли с помощью большой дозы барбитурата и удаляли у них

тонкую кишку. Делали срезы из 5 участков тонкого кишечника, а именно: двенадцатиперстной кишки, нижней подвздошной кишки, среднего отдела тощей кишки, и из участков, расположенных посередине между указанными участками; после чего эти срезы сразу помещали на хранение при -20°C.

После завершения эксперимента срезы тонкой кишки от каждого поросенка оттаивали, вскрывали путем продольного рассечения и соскребали слизистую оболочку предметным стеклом. Эти соскобы (0,2 г) суспендировали в 1,8 мл буфера для серийного разведения WDB), состоящего из фосфатно-буферного раствора (PBS, 0,1 М, pH 7,2), к которому были добавлены Твин 30 (0,05% об/об), альбумин бычьей сыворотки (BSA, 0,25% масс./об), этилендиамин-тетрауксусная кислота (ЭДТК < 1 мМ) и азид натрия (0,1% масс./об.). Затем суспензию соскобов анализировали на присутствие бромелаина с помощью иммуноферментного анализа (ИФА, процедура I описана ниже). Чувствительность этого анализа была установлена предварительно (как 2 нг) путем титрования той же самой партии фермента, что присутствовала в "Detach", но суспендированной в софатно-солевом буфере.

Остаточный бромелаин из Detach - доз был обнаружен во всех участках тонкой кишки обработанных поросят, умерщвленных через 1 и 12 часов после введения дозы. Был также обнаружен бромелаин у одного поросенка (лишь в участках 4 и 5), умерщвленного через 26 часов после введения дозы. Ни один из кишечных соскобов, взятых от контрольных поросят, не обнаруживал реакции в ИФА; такой реакции также не обнаруживал ни один материал, полученный от поросят, умерщвленных через 48 часов или более, после введения дозы.

#### Результаты:

Время прохождения бромелина через тонкий кишечник поросят является таким же, как и время прохождения других пищевых продуктов. Бромелин легко высвобождался в тонкий кишечник.

#### Процедура I.

Имуноферментный анализ на присутствие бромелина

Планшеты: Nunc (Торговая марка)

Сенсибилизация планшета: в этих целях получали иммуноглобулины (IgG), продуцированные против бромелина в кроликах. Для покрытия (2 ч./37°C) разводили в карбонате: бикарбонатном буфере (0,05 М, pH 9,6), содержащем 10 мкг/мл IgG (100 мкл на лунку). До использования хранили при 4°C.

Образцы для испытаний: кишечные соскобы разводили (1:10 масс./объем) в буфере для серийных разведений (WDB), описанном выше. Затем инкулировали 30 минут при 37°C.

Конъюгат: авидин-уреазу (Allelix Inc., Mississauga, Торонто, Канада) разводили (1:400 об/об) в буфере для конъюгирования (Chandler, D.S. и др., *Vet Microbiol.* 11: 153-161, 1966). Инкубировали 30 минут при 37°C.

Субстрат: раствор уреазного субстрата (CSL; Parkville). Считывали при 540 нм (приближенные значения).

Пример 3. Влияние Detach на активность кишечного рецептора K88.

Рецептор *E.coli* K88 является одним из характерных протейновых или гликопротеиновых рецепторов, которые играют важную роль в патогенезе серьезных микробиологических нарушений в тонком кишечнике. Было показано, что рецепторы, расположенные на мембране щеточной каемки эпителия тонкой кишки, участвуют в прикреплении (колонизации) кишечных патогенов и способствуют внедрению в клетку и доставке токсинов. Было проиллюстрировано также, что некоторые из этих рецепторов, включая рецепторы K88, легко инактивируются протеолитическими ферментами, например протеазами, которые обычно являются активными в тонком кишечнике (Wellwood R., *Biochim. Biophys. Acta* 632: 326-335, 1980, Staley T.E. и Winson. J.B. *Mol. Cell. Biochem* 52: 177-189, 1963; Mouricourt, M.A. и Julien R.A., *Infect. Immun.* 55: 1216-1233, 1987).

Через 7-14 дней после рождения поросят накладывали фистулы с помощью "У"-образного приспособления из нержавеющей стали.

На морды поросят надевали плоские приспособления для скорейшего отъема от матери и выкармливали восстановленным молоком до тех пор, пока поросята не достигнут, по крайней мере, 4-недельного возраста.

Активность рецептора K88 оценивали с помощью иммуноанализа (Chandler 1986, *Supra*, обозначаемого далее KPEIA). Кишечные образцы собирали, по крайней мере, в 10% об/об WDB, к которому добавляли 0,1% масс./об. TI. Этот буфер обозначали WDB/TI.

При этом использовали непрерывную процедуру взятия образцов. Эта процедура заключалась в том, что тefлоновую трубку (с внутренним диаметром 4 мм) соединяли с винтовым концом фистулы, а другой конец трубки пропускали через перистальтический

насос, работающий на низкой скорости (0,5-1,0 мл/мин.) и соединяли со сборником образцов. Эти пробирки, содержавшие 1 мл WDB/TI, помещали в коллектор фракций, который обычно используют в колонной хроматографии для постоянного контроля в области химии белков (Frac 100, Pharmacia). В начале каждого дня испытаний в резервуар в виде чана, окружающий стойку с пробирками, помещали лед. Каждая пробирка осуществляла сбор на выходе из насоса в течение 10 минут. Для снижения количества материала на фистуле во время сбора образцов, на трубку, находящуюся между свиньей и насосом, положенную на опоры, подвешивали уравнивающую гирию.

Обработка композицией "Detach".

Для получения базовой рецепторной активности у поросят брали пробы за 24-28 часов до проведения лекарственной терапии с использованием "Detach". Затем поросят обрабатывали 5 мл-дозой Detach-суспензии (содержащей 1 г гранул) за 30 минут до утреннего кормления. Затем проводили непрерывный сбор образцов в течение последующих 48-72 часов.

Результаты:

В течение трехдневных периодов непосредственно до и после введения лекарственного средства было собрано около 1000 образцов. При этом поросят выдерживали на молочной диете. Гораздо больше образцов было собрано в промежуточные периоды, когда был выявлен более четкий, но, в основном, равномерный характер рецепторной активности.

Результаты сбора образцов, осуществляемого в периоды времени непосредственно до и после Detach-терапии поросят, у которых проводили непрерывный сбор проб, показаны в таблице 1.

Наблюдалось снижение рецепторной активности после лекарственной обработки, и это снижение подтверждалось односторонним анализом (с дисперсией в пределах статистической значимости ( $P = 0,05$ ), проведенным в период 0-1 и 1-2 дня после введения лекарственной дозы. Эти данные подтверждают предварительные наблюдения относительно разрушительного воздействия бромелаина на связывание между различными колониями (включая K88) и токсинами и их кишечными рецепторами *in Vitro*-экспериментах. Полученные результаты также подтверждают высказанную ранее гипотезу, что бромелаин, который высвобождается в кишечник благодаря продемонстрированным свойствам композиции "Detach",



оказывает разрушающее действие на рецепторы патогенов, предупреждая тем самым возникновение ряда кишечных инфекций. Величины, показанные в таблице 1, представляют собой средние значения оптической плотности (A540)  $\pm$  стандартное отклонение. Число проб, взятых в течение каждого периода времени, по казану в скобках, ниже оказанных средних значений.

Пример 4. Профилактические меры по борьбе с диареей в течение длительного периода времени (6 дней жизни до отъема примерно на 21 день).

Для демонстрации эффективности Detach-обработки в целях предупреждения диареи у поросят, был проведен ряд экспериментов в естественных условиях. Эти эксперименты показали, что Detach-обработка с использованием разовой пероральной дозы является хорошей профилактической мерой для предупреждения диареи у поросят после отъема (которая обычно ассоциируется с патогенами K88+E.coli). Кроме того, было обнаружено, что терапевтическая Detach-обработка является эффективной мерой (также в виде разовой пероральной дозы) для борьбы против диареи у поросят до их отъема (сосунки). Понос у поросят до их отъема у матери обычно ассоциируется с ротавирусной или кокцидиальной инфекцией и проявляется обычно у поросят в возрасте 1 недели и продолжается в течение 1-3 недель в виде хронического пастообразного поноса. Несмотря на более хроническую природу этих заболеваний, одноразовая доза Detach, вводимая поросятам в том возрасте, когда у них обычно начинаются симптомы диареи, способствовала предупреждению у них этого заболевания.

#### Методы:

Эксперименты проводили на ферме в центрально-западной части штата Виктория в Австралии, которая представляет собой коммерческое хозяйство по разведению животных.

Альтернативно молодых племенных свинок и свиноматок распределяли на Detach-обрабатываемые и контрольные группы. В этом испытании было использовано всего 30 пометов поросят: 15 в обрабатываемой группе и 15 в контрольной группе. Поросят выкармливали одновременно до трехдневного возраста, после чего каждый приплод взвешивали. Detach-обрабатываемой группе поросят вводили разовую (5 мл) пероральную дозу Detach на 6 день. Контрольной группе Detach не вводили. Затем поросят снова взвешивали в день отъема и переноса в условия аккомодации к отъему. До отъема

поросят регистрировали случаи возникновения диареи, режим обработки и смертность. Измеряли также прирост массы и смертность для конкретного режима обработки.

#### Результаты:

Данные, полученные до отъема поросят, представлены в таблице 2.

Значимость полученных результатов вычисляли с помощью анализа дисперсии ковариантов (если они имелись) по параметрам "поросята-помет" и "вес на день 3". Возрасты при отъеме были в основном одинаковыми и выбирались, исходя из практики содержания животных, а не исходя из продуктивности свиной. Однако критерии по другим параметрам дали высокосignификантные результаты, которые показали снижение заболеваемости на 82%.

Этот эксперимент ярко продемонстрировал эффективность разовой дозы Detach для предупреждения поноса у поросят до отъема. Все релевантные критерии показали высокосignификантный положительный результат обработки. Прирост в весе поросят-отъемышей составлял 2 кг, а заболеваемость у обработанных поросят снижалась на 60%. Поскольку гибели животных не наблюдалось, то сравнение по этому параметру было сделать невозможно.

Несмотря на фармакологически кратковременное действие Detach, оказалось, что ранняя доза этой композиции, введенная до отъема поросят, имеет стойкое воздействие.

Как показал этот эксперимент, что, если только нет клинических или экспериментальных данных о наличии поноса у поросят до их отъема, то предпочтительной схемой обработки композицией Detach является введение ее разовой дозы поросятам до их отъема от матери. Эффективность Detach-обработки для предупреждения поноса у поросят до отъема совершенно очевидна.

Для оценки эффективности Detach-обработки в целях предупреждения поноса у поросят до отъема (сосунков) было проведено еще пять экспериментов (данные не приведены). В этих экспериментах поросятам через 5 дней после рождения была перорально (с использованием шприца) введена 5 мл-доза Detach (как в примере 1). Эти эксперименты со всей очевидностью продемонстрировали снижение заболеваемости поносом у поросят-сосунков, а также успешное лечение поносов у поросят после отъема. Поросята, обработанные Detach, также обнаруживали прирост в весе, улучшение общего состояния и снижение заболеваемости в целом.

Гистологические анализы ряда контрольных и обработанных поросят показали, что значительное число поросят были ротавирус-положительными, а в образцах, взятых после смерти, были обнаружены кокцидии. В противоположность этому у Detach обработанных поросят указанных инфекций обнаружено не было.

Для определения эффективности и Detach в предупреждении поноса у отъемышей был проведен ряд дополнительных экспериментов. Всего в этих испытаниях участвовало 1705 поросят, из которых 502 использовали как негативный контроль, 100 - как позитивный контроль, 503 поросятам вводили 1 г Detach в виде геля (как в примере 1), а 600 поросятам проводили альтернативные съемы обработки. Эти исследования со всей очевидностью проиллюстрировали эффективность Detach. Ни один поросенок, которому вводили разовую дозу Detach не погиб от поноса, вызываемого *E.coli*. По сравнению с 16 контрольными или обработанными антибиотиком поросятами, погибшими от поноса, из Detach-обработанных поросят погибли только 2. Кроме того, Detach-композиция является высокоэффективной в снижении смертности поросят при данной обработке. По-видимому, наиболее значительные результаты описанных экспериментов заключались в том, что композиция Detach позволяет в три раза снизить количество вводимых лекарственных средств, необходимых для традиционного лечения поноса у поросят-отъемышей.

#### Пример 5.

Роль энтеротеротоксигенной бактерии *EScherichia coli* (ETEC) как важного этиологического фактора при возникновении диареи у человека была хорошо описана в литературе (Sussman M., *The Virulence of E.coli*, *Reviews of Methods. Soc. Gen. Micro.*, 1985). Эти микроорганизмы отличаются своей способностью продуцировать как один, так и оба термостойкий (LT) энтеротоксин и неустойчивый к воздействию тепла (LT) энтеротоксин (Gaastra, W. и de Graaf. F.K., *Micro. Rev.* 46:129-161, 1982). Некоторые штаммы этих бактерий также продуцируют антигенные факторы колонизации (CFA) или пили, позволяющие ETEC-штаммам "прилипать" к слизистой оболочке кишки. Эти пили облегчают колонизацию и позволяют доставлять энтеротоксины, вырабатываемые указанными микроорганизмами, непосредственно к эпителиальным клеткам-мишеням (Gaastra и др., см. выше).

В этом эксперименте описана модель RITARD Spira и др. (*Infect, Immun.* 32:

739-747, 1981), которую использовали для испытания эффективности in Vivo Detach-композиции примера 1 в ингибировании связывания CFA/I-положительных *E.coli* со слизистой оболочкой кишечника кролика.

#### Материалы и методы:

**Животные:** в эксперименте использовали новозеландских белых племенных кроликов обоих полов, полученных от одного производителя. Вес кроликов составлял от 1,5 до 2,7 кг.

**Бактерии:** используемые в этом эксперименте штаммы ETEC были первоначально выделены от пациентов с диареей, проживающих в Бангладеш. Штаммы H10407p были легко получены Д.С.ЕVans (Хьюстон, Техас) (*Infect. Immun.* 19: 727-736, 1978). Штамм E1392/ 75 7A (серотип 06:K15:H16) был получен В.Рowe (Лондон, Великобритания). Штамм H10407 продуцирует как ST-, так и LT-токсины, и обладает антигеном факторов колонизации (CFA/I). Штамм H10407p продуцирует как ST-, так и LT-токсин, однако он не продуцирует CFA/I. Штамм E1392/75 7A не имеет пилей и является нетоксигенным спонтанным лабораторным производным CFA/II  $\pm$  *E.coli* 1392 (Sack R.B. и др., *Infect. Immun.* 56: 378-394, 1988), причем было установлено, что этот штамм не способен к колонизации и не способен индуцировать диарею в RITARD-модели (Wanke, C.A. и др., *Infect. Immun.* 55: 1924-1926, 1987).

Штаммы инокулировали в CFA-агар (Evans, см. выше) и культивировали в течение ночи при 37°C. Затем бактерии собирали, промывали в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе (0,01 М, pH 7,2; PBS) и разводили до нужной оптической плотности, бактериальную концентрацию также определяли путем подсчета жизнеспособных клеток на чашках (в дубликате) с кровяным агаром после серийного разведения в PBS. Все культуры анализировали на CFA/I- и LT-продуцирование с помощью специфического иммуоферментного анализа (ИФА) до инокуляции кроликов.

#### Модель RITARD:

В данном эксперименте использовали модель RITARD, разработанную Spira и др. (см. выше), но с небольшой модификацией, описанной ниже. До контрольного заражения, половине кроликов от каждой группы (таблица 1) вводили пероральные дозы 0,42 г гранулированной композиции примера 1, под названием Detach, и этих кроликов держали на голодной диете 18 часов (но при этом воду давали ad libitum).

Наблюдение за развитием заболевания:

В течение 24 часов после контрольного заражения, кроликов еже часно контролировали на диарею, слабость или смертность. При анализе на диарею всех кроликов распределяли по категориям в соответствии со следующей шкалой оценок: 0 - диарея отсутствует; 1 - легкая диарея с испражнениями более жидкими, чем нормальный кал; 2 - умеренная диарея, по крайней мере, с тремя водянистыми испражнениями; и 3 - тяжелая диарея с частыми водянистыми испражнениями. При отхождении кала у кроликов собирали фекальные пробы, а в том случае, если отхождения кала не было, то брали ректальные пробы. Штаммы контрольного заражения идентифицировали с помощью морфологического анализа путем сравнения с типичными колониями *E.coli*, и с помощью ИФА.

Сбор образцов тканей:

Через 24 часа после контрольного заражения всех животных умерщвляли и исследовали жидкость, находящуюся внутри тонкой кишки. Путем исследования больших объемов жидкости, взятой из тонкой кишки (>60 мл) эутанизированных или погибших кроликов, было установлено, что диарея является главной причиной гибели животных. Были получены срезы (2 x 3 см) тонкой кишки из пяти различных участков, а именно: из двенадцатиперстной кишки (S1); проксимальной области тощей кишки (S2); срединной области тощей кишки (S3); дистальной области тощей кишки (S4); из подвздошной кишки (S5). Каждый сегмент был вскрыт путем продольного разреза и тщательно промыт в стерильном PBS для определения прочно связывающихся бактерий; либо был оставлен непромытым для определения полного числа присутствующих бактерий. Количественные культуры получали путем гомогенизации ткани в течение 1 минуты с использованием гомогенизатора Sorvall на полной скорости. Серийные разведения проводили в PBS и 25 мкл-алк-воты культивировали на кровяном агаре и CFA-агаре. После 18-часового инкубирования при 37°C определяли число бактерий на 1 см ткани. Другие образцы были сразу обработаны путем фиксации в 10% нейтральном забуференном формалине для использования в гистологическом анализе. После того, как образцы были залиты в парафин, проводили окрашивание гематоксилин-эозином и окрашивание тканей по Граму.

Статистические анализы:

Результаты бактериального подсчета преобразовывали в логарифмические величины для стабилизации дисперсий и анализировали с использованием GENStat 5. Эффективность Detach -защиты определяли в соответствии с программой Fortran-Finney, которая используется для определения эффективности (%) в хемо-терапевтических тестах (Finney D.J., Statistical Method in Biological Assay, Pub. Charles Griffin and Company Ltd., 1952).

Результаты:

Группам кроликов вводили  $1 \times 10^{11}$  бактерий различных штаммов *E.coli* и стерильный PBS; и в течение 24-часового инкубационного периода наблюдали реакцию продуцирования диареи. Полученные результаты представлены в таблице 3. В целях введения энтеротоксигенного штамма, содержащего пилы (H10407); лишь энтеротоксигенного штамма (H10407p) и нетоксигенного и не имеющего пилей штамма (E1392/75/7A) отбирали различные комбинации энтеротоксинов и факторов колонизации *E.coli*. Для наблюдения за результатами операции и Detach-обработки без контрольного заражения бактериями использовали PBS-контроль.

Ни один из кроликов, обработанных 10 миллилитрами стерильного PBS, не заболел диареей. Аналогично ни один из кроликов, подвергнутых контрольному заражению не имеющими пилей штаммами H10407p и E1392/75/7A, не заболели диареей. При аутопсии, объемы жидкостей в тонком кишечнике от привратникового сфинктера до места соединения подвздошной и слепой кишки составляли от 10 до 50 мл.

Из восьми контрольных (не обработанных Detach) кроликов, подвергнутых провокационному заражению штаммом H10407, семь погибали или имели обильный водянистый понос. При аутопсии объем жидкости в их тонком кишечнике составлял от 20 до 105 мл. Однако полный объем жидкости в малой и большой кишках составлял от 130 до 165 мл (по сравнению с 10-50 миллилитрами у кроликов, инокулированных штаммами E1392/75 7A и H10407p и PBS).

Из кроликов, которые до H10407-заражения были обработаны композицией Detach, погиб лишь один. Этот кролик погиб через 11 часов после контрольного заражения с отхождением частых жидких испражнений. Из остальных шести кроликов, обработанных композицией Detach, ни один не имел поноса, а большинство (4 из 6) имели фекалии нормальной формы с отхождением кала через 24 часа. При аутопсии содержи-

мое толстой кишки было твердым, а накопление жидкости в тонкой кишке составляло от 12 до 60 мл.

#### Бактериальная адгезия.

В целях исследования адгезии бактерий контрольного заражения в различных участках тонкого кишечника, от всех животных получали культуры для количественного анализа. Все образцы промывали стерильным PBS и определяли число бактерий, прикрепившихся к слизистой оболочке кишки, присутствие бактерий контрольного заражения наблюдалось на всех участках; причем наиболее обильная колонизация обнаруживалась для CFA/I<sup>+</sup> -штамма H10407. Средние результаты, полученные для культур SFA/I<sup>+</sup> -бактерий в различных участках кишки не обработанных Detach кроликов, варьировались от более низких значений при S1, S2, S4, S5 ( $8,7 \times 10^7$ ,  $6,2 \times 10^7$ ,  $1,04 \times 10^8$  и  $6,2 \times 10^8$  колониеобразующих единиц (КОЕ) (см.соответственно) до постоянно более высоких значений при S3 ( $6,2 \times 10^9$ ). Эти результаты показаны в таблице 4. В последующих анализах для сравнения были использованы культуры бактерий из S3.

Число CFA/I<sup>+</sup> -бактерий, прикрепленных к слизистой оболочке кишечника Detach-обработанных кроликов, варьировалось от  $1,3 \times 10^4$  (минимальное количество) до  $1,2 \times 10^7$  КОЕ/см (в среднем  $2,6 \times 10^6$  КОЕ/см). Это число КОЕ/см в 2000 раз меньше, чем величина КОЕ/см для контрольных кроликов, зараженных тем же самым штаммом ( $p < 0,05$ ). В Таблице 4 проиллюстрировано различие в числе колоний для Detach-обработанных и необработанных животных.

Из эксперимента, описанного в этом примере, видно, что Detach-препараты значительно уменьшают кишечную флору. Очевидно также, что обедняемая микрофлора относится к патогенным микроорганизмам. Поэтому эти микроорганизмы могут быть заменены предпочтительными микроорганизмами, например, происходящими от здоровых животных. Примерами таких микроорганизмов могут служить так называемые "пробиотики", такие, как стрептококки и молочнокислые бактерии.

Число бактерий, связанных со слизистой тонкого кишечника кроликов, инфицированных CFA/I-H10407p, варьируется от  $1,3 \times 10^4$  КОЕ/см (минимальное количество) до  $6,6 \times 10^7$  КОЕ/см для кроликов с легкой диареей (в среднем  $1,6 \times 10^7$  КОЕ/см). Колонизация CFA/II<sup>+</sup> происходит на аналогичном уровне, т.е. число колоний (КОЕ/см) составляет от  $1,3 \times 10^4$  (минимальное число) до  $1,3 \times 10^8$ , а в среднем =  $3,9 \times 10^7$ . Таким образом, не

наблюдалось значительного различия в числе бактериальных колоний для Detach обработанных и необработанных животных, подверженных контрольному заражению любым штаммом, не содержащим пилей.

У кроликов, которые получали лишь PBS, в тонкой кишке присутствовало относительно небольшое количество бактерий (в среднем =  $1,3 \times 10^4$  КОЕ/см).

#### Выделение бактерий с фекалиями

От кроликов, у которых было отхождение кала, получали мазки. У всех животных, подвергнутых контрольному заражению, в фекалиях обнаруживались бактерии. При аутопсии были взяты ректальные мазки. Присутствие в прямой кишке штамма контрольного заражения наблюдалось у всех кроликов, включая тех, у которых не было отхождения кала до окончания эксперимента. 20 всех случаях 100% культивированных колоний были от штамма контрольного заражения.

#### Гистология.

При гистологическом исследовании под оптическим микроскопом тканей тонкой кишки, полученных от всех кроликов, не было обнаружено каких-либо аномалий слизистой оболочки. Тот факт, что микроорганизмы лишь изредка обнаруживаются на слизистой оболочке, позволяет предположить, что бактерии прикрепляются в определенных участках, а не по всей кишке.

#### Обсуждение:

Известно, что имеется большое сходство между механизмами патогенеза ЕТЕС-инфекций человека и животных. Большинство штаммов ЕТЕС, происходящих от человека и животных, используют для своей адгезии пили и после адгезии образуют колонии в тонкой кишке. Как у человека, так и у животных, диарея возникает в результате продуцирования и эффективной доставки энтеротоксинов, вырабатываемых этими бактериями, к тканям кишечника.

В данном эксперименте было показано, что пероральное введение Detach, то есть препарата, содержащего протеазу, позволило успешно снизить заболеваемость диареей и смертность от диареи (на 86%, 6 из 7) у кроликов, инфицированных CFA/I-положительным штаммом H10407. 87% (7 из 8) контрольных кроликов, не получивших Detach, погибали от диареи или страдали тяжелой диареей. Ранее Walke и др. (см. выше) сообщали, что пороговое значение для появления клинических симптомов инфекционной диареи составляет  $10^8$  КОЕ на 1 см площади тонкого кишечника. В этом эксперименте, кролики, подвергнутые контрольно-

му заражению бактериальными штаммами, о которых известно, что они не обладают факторами колонизации, не заболевали диареей, а уровень колонизации бактерий у них был ниже порогового значения  $10^7$  этих кроликов не наблюдалось различия в уровнях колонизации между различными группами обработки. Альтернативно у Detach-необработанных кроликов, подвергнутых контрольному заражению штаммом H10407, обладающим пиллями, уровень бактериальной колонизации составлял значительно выше  $10^7$  (в среднем  $6,2 \times 10^9$ ). У Detach-обработанных кроликов, подверженных контрольному заражению тем же самым бактериальным штаммом, наблюдалась колонизация лишь на уровнях, аналогичных уровням, наблюдавшимся для бактерий, которые, как известно, не обладают CFA (в среднем  $= 2,6 \times 10^6$ ). В соответствии с вышеуказанным, очевидно, что пероральная Detach обработка способствует эффективной модификации поверхности слизистой оболочки тонкого кишечника кролика, таким образом, что колонизация CFA/I<sup>+</sup>- бактерий значительно снижается ( $p < 0,05$ ).

Результаты, полученные для кроликов, могут быть вполне полезны и для человека, поскольку между ETEC-патогенными инфекциями у человека и животных имеется большое сходство. Действительно, кролики представляют собой стандартную модель для исследовании бактериальных инфекций у человека.

Лечение человека с использованием Detach-препаратов может служить залитой, например, от заболеваний, вызываемых энтеротоксигенными *EScherichia coli*. Такая защита может быть обусловлена, например, деградацией/модификацией кишечных рецепторов для вирулентных детерминант ETEC человека, вызывающих диарею, таких, как антигены факторов колонизации CFA/I, CFA/II, CFA/III и CFA/IV.

Эксперименты, проведенные заявителем (данные не приводятся), показали, что обработка тонкой кишки человека протеазой (папаином) приводит к значительному снижению бактериальной адгезии энтеротоксигенной бактерии *EScherichia coli*, а в частности, к снижению связывания CFA/I и энтеротоксина с кишечными препаратами и полному ингибированию связывания CFA/II. Эти данные показали, что Detach-препараты должны быть эффективными при введении *in Vivo* человеку в целях предупреждения заболеваний, вызываемых энтеротоксигенными *E.coli*.

Пример 6.

Повышение уровней глобулина после обработки Detach-композицией.

Этот эксперимент был разработан для моделирования физиологии человека с использованием модели свиньи в целях определения влияния больших доз Detach ( $>1$  г) на биохимические параметры сыворотки. Для исследования изменения в сывороточных уровнях глобулина были использованы 10-кратные дозы.

Эксперимент:

Для эксперимента использовали 15 свиней в возрасте 10-16 недель.

Группа А - 8 необработанных свиней

Группа В - 7 свиньям вводили Detach (10 г) 3 раза в день в течение 2 или 5 дней.

Для обеих групп биохимические параметры сыворотки, взятой до обработки и после обработки, сравнивали в целях выявления воздействия обработки.

Результаты:

Полученные результаты показали значительное увеличение ( $p = 0,043$ ) уровней глобулина в сыворотке у свиней, которые были обработаны большими дозами Detach. Более низкие дозы Detach (10 г) не дали значительных изменений (данные не приводятся).

Уровни глобулина были исследованы дополнительно. Уровни альфа-, бета- и гамма-глобулина были проанализированы посредством электрофореза с использованием ацетата целлюлозы и количественно оценены с помощью денситометра. Результаты представлены в таблице 5.

В среднем увеличение уровня гамма-глобулина составило 170%. Относительно уровней альфа- и бетаглобулина трудно сделать какие-либо определенные выводы, поскольку эти уровни варьировались от образца к образцу. Однако наблюдалось постоянное увеличение уровней гамма-глобулина.

Изменения уровней гамма-глобулина от уровней до обработки и до уровней после обработки для двух оказанных групп были проанализированы путем оценки дисперсии данных. В результате этой оценки было остановлено, что полученное увеличение уровней является статистически значимым ( $P = 0,03$ , 0-99,5%). Кроме того, была определена антигенная специфичность (и класс антитела) гамма-глобулинов.

Полученные результаты показали увеличение уровней гамма-глобулина в сыворотке, которое могло иметь место за счет уровней неспецифического гамма-глобулина, возрастающих после введения Detach композиций. Повышение уровней IgG в сыворотке может

также иметь важное значение для защитных свойств слизистой оболочки кишечника. Эти выводы могут служить объяснением для широкого спектра противомикробного действия Detach-композиции, которая, как было установлено, является эффективной против бактериальной, вирусной и протозойной инфекций.

#### Пример 7

Предупреждение поносов у телят.

Для оценки эффективности композиции Detach в предупреждении поносов у телят проводили испытания на ферме близ Wagragul в штате Виктория. Эти испытания проводили в конце периода весеннего отела в Gippsland, где главным микроорганизмом, выделенным от зараженных животных, в течение нескольких последних лет был *Cryptosporidia*.

Испытания проводили на шести молочных фермах. На всех этих фермах фермеры в течение многих лет имели убытки в результате высокой заболеваемости животных, вызываемой этим микроорганизмом.

#### Материалы:

Композиция "Detach" в соответствии с примером 1.

Доза: 35 мл в виде геля.

#### Метод:

Дозу Detach, составляющую 35 мл, повторно вводили (если это было необходимо) примерно через интервалы времени 3-4 дня. Всего каждому теленку вводили не более пяти доз.

Вообще в естественных условиях у телят возникает понос в основном в возрасте от 1 до 4 недель. Обычно на 28 день телят удаляют из бокса для выращивания молодняка в загон для телят, поскольку к этому возрасту телята становятся менее восприимчивыми к заболеваниям. Регистрировались дни заболевания поносом, дозы вводимых антибиотиков и электролитов. Кроме того, регистрировались даты гибели животных с указанием причины гибели, если таковая была известна. Образцы кала посылались в лабораторию для анализа. С ферм, на которых имели место случаи гибели животных, также посылали для анализа образцы кишечного содержимого.

Для того, чтобы определить имеются ли значительные различия в степени роста между двумя группами, телят на двух

фермах взвешивали в конце испытаний, при этом никакой разницы в степени роста между этими группами обнаружено не было.

Данные относительно количества дней заболевания поносом и количества используемых антибиотиков на 1 теленка были проанализированы с помощью двустороннего критерия.

Данные относительно смертности были проанализированы с помощью критерия хи-квадрат. Результаты испытания систематизированы в таблице 6.

Почти на каждой ферме Detach-обработка способствовала значительному снижению смертности у телят, а также снижению необходимой дозы антибиотиков и электролитов. Смертность снизилась на 25 - 4% ( $P < 0,01$ ). Необходимая доза антибиотиков снизилась до 1 - 0,34 дозы на теленка. Дозы электролита показали небольшое изменение, а именно 3,18 доз на контрольного теленка и 2,98 доз на обработанного теленка.

Число дней, в которые у теленка регистрировали понос, также снизилось, то есть от 2,33 дней для контрольных телят до 1,46 дней для обработанных телят (разница  $P < 0,01$ ).

Наилучший эффект наблюдался в отношении данных по смертности. Как предполагается, причиной смертности телят от поноса является *Cryptosporidia*, доминирующий патоген, выделенный из фекалий или образцов, взятых после смерти животных. *Cryptosporidia* является в высокой степени патогенным кишечным паразитом молодых телят, против которого все имевшиеся до настоящего времени способы обработки были неэффективными. При этом у теленка, страдающего поносом, вызванным этим патогеном, смерть наступала уже через один-два дня после возникновения поноса. В некоторых случаях животное выживало после введения электролитов в течение нескольких недель, но находилось в состоянии крайнего истощения. Композиция Detach может дать реальный эффект при лечении этого заболевания.

Было показано, что две или более дозы Detach (35 мл) способствуют предохранению телят от инфекции, вызываемой *Cryptosporidia*, и снижают потребность в лечении антибиотиками.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, включающая в себя:

(I) гранулы, содержащие биологически активное вещество в сочетании со слабым

основанием и частично покрытые материалом замедленного высвобождения, который является растворимым в кишечном соке;

(II) подкисляющий агент, имеющий в растворе рН от около 1,5 до около 6 и;

(III) гелеобразующий агент.

2. Композиция по п.1, *отличающаяся* тем, что биологически активным веществом является белок, такой как фермент, фактор роста или гормон.

3. Композиция по п.2, *отличающаяся* тем, что оказанный белок является ферментом, выбранным из бромелина, папаина, фицина, химотрипсина, трипсина, рибонуклеазы, карбоксипептидата А или В, или субтилизина.

4. Композиция по п.1, *отличающаяся* тем, что биологически активным веществом является непротеиновое биологическое вещество.

5. Композиция по п.4, *отличающаяся* тем, что непротеиновым биологическим веществом является витамин, кофактор, ион металла или антибиотик.

6. Композиция по п.1, *отличающаяся* тем, что гелеобразующий агент образует гель после смешивания с водным или другим растворителем.

7. Композиция по п.1, *отличающаяся* тем, что от 10 до 90% площади поверхности гранул покрыты материалом замедленного высвобождения.

8. Композиция по п.1, *отличающаяся* тем, что подкисляющий агент представлен в виде микрочастиц.

9. Композиция по п.1, *отличающаяся* тем, что образует подкисленный гель, содержащий микрогранулы, при добавлении водного раствора.

10. Композиция по п.1, *отличающаяся* тем, что кроме того содержит один или несколько антибиотиков.

11. Композиция по п.1, *отличающаяся* тем, что состоит из подкисленного геля, имеющего рН от около 1,5 до около 6 и содержащая микрогранулы, которые включают в себя биологически активное вещество в сочетании со слабым основанием и которые частично покрыты материалом замедленного высвобождения, растворимым в кишечном соке.

12. Композиция по п.11, *отличающаяся* тем, что биологически активным агентом является белок, такой, как фермент, фактор роста или гормон.

13. Композиция по п.12, *отличающаяся* тем, что указанный белок является ферментом, выбранным из бромелина, папаина, фицина, химотрипсина, трипсина, рибонуклеазы, карбоксипептидата А или В, или субтилизина.

14. Композиция по п.11, *отличающаяся* тем, что биологическим веществом является непротеиновое биологическое вещество.

15. Композиция по п.14, *отличающаяся* тем, что непротеиновым биологическим веществом является витамин, кофактор, ион металла или антибиотик.

16. Композиция по п.11, *отличающаяся* тем, что от около 10 до около 90% площади поверхности гранул покрыто материалом замедленного высвобождения.

17. Композиция по п.11, *отличающаяся* тем, что, кроме того, содержит один или несколько антибиотиков.

18. Способ доставки биологически активного вещества в верхний отдел тонкого кишечника животного, *отличающийся* тем, что композицию по любому из п.1-9 подвергают реакции с соответствующим раствором для образования геля, а затем полученный таким образом гель перорально вводят животному.

19. Способ доставки биологически активного вещества в верхний отдел тонкого кишечника животного, заключающийся в пероральном введении животному композиции по любому из п.п. 10-14.

20. Способ обработки кишечных патогенов у животных и/или лечения заболеваний, связанных с инфекциями, вызываемыми кишечными патогенами, *отличающийся* тем, что композицию по п.1, где оказанным биологически активным веществом является протеаза, подвергают реакции с соответствующим раствором для образования геля, после чего полученный таким образом гель перорально вводят животному.

21. Способ обработки кишечных патогенов у животных и/или лечения заболеваний, связанных с инфекциями, вызываемыми кишечными патогенами, *отличающийся* тем, что перорально вводят животному терапевтически эффективного количества композиции по п.11, где указанным биологически активным веществом является протеаза.

22. Способ по п.20 или 21, *отличающийся* тем, что указанной протеазой является бромелин.

23. Способ по любому из пунктов 20-21, *отличающийся* тем, что указанным кишечным патогеном являются бактерии, вирус или паразит.

24. Способ по п.23, *отличающийся* тем, что оказанных кишечных патогенов выбирают из энтерококкогенных бактерий *Escherichia coli*, *Shigella*, *Yersinia*, *Plesiomonas*, вибрионов, *Aeromonas*,

Campylobacter, ротавирусов, Cryptosporidia или Coccidiosis.

25. Способ по п.20 или 21, *отличающийся* тем, что указанная композиция, кроме того, содержит один или несколько антибиотиков.

26. Способ по п.20 или 21, *отличающийся* тем, что одновременно или почти одновременно вводят один или несколько антибиотиков.

27. Способ по п.20 или 21, *отличающийся* тем, что оказанным животным является моножелудочное или неполовозрелое жвачное животное.

28. Способ по п.20 или 21, *отличающийся* тем, что указанным животным является человек, свинья, теленок, лошадь, рыба или ракообразное.

29. Способ лечения диареи у животного, *отличающийся* тем, что указанному животному вводят подкисленный гель, имеющий pH от около 1,5 до около 6, причем указанный гель содержит микрогранулы, включающие в себя протеолитический фермент в сочетании со слабым основанием, и частично покрытые материалом пролонгированного высвобождения, который является растворимым в кишечном соке.

30. Способ по п.29, *отличающийся* тем, что указанным протеолитическим ферментом является бромелин.

31. Способ по п.28, *отличающийся* тем, что указанный гель, кроме того, содержит один или несколько антибиотиков.

32. Способ по п.28, *отличающийся* тем, что одновременно или почти одновременно вводят один или несколько антибиотиков.

33. Способ неспецифического стимулирования иммунной системы животного, *отличающийся* тем, что композицию по п.1, где указанным биологически активным веществом является протеаза, подвергают реакции с соответствующим раствором для образования геля, и полученный таким образом гель перорально вводят животному.

34. Способ неспецифического стимулирования иммунной системы животного, *отличающийся* тем, что перорально вводят животному композицию по п.10, где указанным биологически активным веществом является протеаза.

35. Способ по п.33, *отличающийся* тем, что указанной протеазой является бромелин.

36. Способ по п.33, *отличающийся* тем, что указанными животными является человек, свинья, теленок, лошадь, рыба или ракообразное.

37. Применение композиции по п.1, *отличающийся* тем, что указанным биологически активным веществом является протеаза для получения лекарственного средства, предназначенного для обработки кишечных патогенов и/или для лечения диареи у животных.

38. Применение по п.37, *отличающийся* тем, что указанной протеазой является бромелин.



Таблица I

Поросята с непрерывным сбором проб: активность рецептора K38  
в пробах кишечного содержимого, собранных в течение трех дней  
по введения или после введения лекарственного средства (во  
 время непрерывного сбора образцов, поросят выдерживали на мо-  
 лочной диете).

Поросята	Активность рецептора K38*			
	Предварительная обработка	Пост-обработка		
	(Дни -3 -0)	(день 0-1)	(день 1-2)	(день 2-3)
I $\varnothing$ ЕТАСН	0,71+/-0,11 (21)	0,19+/-0,15 (16)	0,33+/-0,29 (40)	0,17+/-0,19 (15)
I $\varnothing$ ЕТАСН	0,28+/-0,1 (79)	0,34+/-0,21 (30)	0,05+/-0,10 (24)	
2 $\varnothing$ ЕТАСН	0,28+/-0,22 (68)	0,08+/-0,08 (42)	0,11+/-0,15 (38)	0,06+/-0,09 (42)
2 $\varnothing$ ЕТАСН	0,55+/-0,19 (39)	0,11+/-0,10 (25)		
3 $\varnothing$ ЕТАСН	0,30+/-0,17 (78)	0,15+/-0,10 (34)	0,23+/-0,20 (15)	0,24+/-0,24 (35)

\* Средние величины оптической плотности, полученные из проб  
 кишечного содержимого, исследованных с использованием КРЕИА.

Таблица 2

Результаты, полученные до отъема поросят

Свинки	<i>Detach</i> (+ср. кв. ош.)	Контроль (+ср. кв. ош.)	Значимость
I	2	3	4
Свинки/помет (день 3)	9,87(1,66)	9,73(1,16)	0,745
Вес свинки - день 3 (кг)	1,66(0,09)	1,71(0,15)	0,532
Смертность (понос)	0,07(0,26)	0,07(0,26)	0,938
I	2	3	4
Лечение поноса/помет	4,2 (1,93)	22,67 (6,38)	0,001
Пороенок-отъемыш (кг)	8,05(0,45)	5,97 (0,48)	0,001
Дни до отъема	30,00(2,2)	29,27( 1,67)	0,41
Прирост в весе до отъема	6,38(0,45)	4,25 (0,54)	0,001
Ежедневный прирост живого веса	213 (0,17)	145 (19)	0,001
I	2	3	4
Лечение поноса/помет	4,2 (1,93)	22,67 (6,38)	0,001
Пороенок-отъемыш (кг)	8,05(0,45)	5,97 (0,48)	0,001
Дни до отъема	30,00(2,2)	29,27( 1,67)	0,41
Прирост в весе до отъема	6,38(0,45)	4,25 (0,54)	0,001
Ежедневный прирост живого веса	213 (0,17)	145 (19)	0,001

Таблица 3

Возникновение диареи у кроликов, обработанных или не обработанных *Detach*-композицией и подвергнутых контрольному заражению различными штаммами ЕТЕС

Группа	Штамм	Адгезин	Токсин	Обработка	Ответное возникновение диареи <sup>а</sup>
А	Н10407 <sup>б</sup>	СРА/І <sup>+</sup>	Т <sup>+</sup> Т <sup>+</sup>	∅	1/7 <sup>с</sup>
				С	7/8 <sup>о</sup>
В	Н10704р	СРА/І <sup>-</sup>	Т <sup>+</sup> Т <sup>+</sup>	∅	1/4 <sup>с</sup>
				С	1/4 <sup>с</sup>
С	Е1392/75 7А	СРА/ІІ <sup>-</sup>	Т <sup>-</sup> Т <sup>-</sup>	∅	0/4
				С	0/4
∅	РВЗ			∅	0/4
				С	0/4

<sup>а</sup> = число животных, заболевших диареей или погибших/полное число испытуемых животных.

<sup>б</sup> = пять кроликов выбыли из анализов из-за их гибели, не связанной с диареей.

<sup>с</sup> = легкая диарея

<sup>д</sup> = кролики, выжившие после инфицирования; число колоний, подсчитанных в 3 участках, составляло  $5,8 \times 10^9$ .

<sup>е</sup> = *Detach*-обработанный кролик погиб; число колоний, подсчитанных в 3 участках, составляло  $1,2 \times 10^7$ .

Таблица 4

Среднее число колоний, образующихся в тонкой кишке после контрольного заражения по методу RITAR  $\emptyset$  ( $10^{11}$  КОЕ на животное)

Группа	Штамм	Обработка	Колонизация		
			$\emptyset$ I	$\emptyset$ 3	$\emptyset$ 5
A	HI0407	$\emptyset$	$2,9 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$
		C	$8,7 \times 10^7$	$6,2 \times 10^9$	$6,2 \times 10^6$
B	HI0407	$\emptyset$	$1,0 \times 10^8$	$2,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$
		C	$1,9 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^{10}$
C	EI392/75 7A	$\emptyset$	$6,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$5,9 \times 10^6$
		C	$7,5 \times 10^6$	$5,0 \times 10^7$	$2,1 \times 10^{10}$
$\emptyset$	PVS	$\emptyset$	$2,0 \times 10^6$	$5,9 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$
		C <sup>a</sup>	$3,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$

<sup>a</sup> = исключая кролика с очень сильной колонизацией

Таблица 5

Уровни глобулина в сыворотке

Свинья №	Обработка	Увеличение гамма-глобулина
225	C	1,41
204	C	-0,24
202	C	1,32
242	C	0,04
240	C	0,28
219	C	2,21
203	$\emptyset$	2,16
228	$\emptyset$	2,53
224	$\emptyset$	1,51
217	$\emptyset$	1,22
214	$\emptyset$	2,06
236	$\emptyset$	4,07

Таблица 6

Суммарные данные испытаний *Detach*, проведенных на телятах

	Обработанные	Контроль	P
Число телят	50	55	
Смертность %	4%	25%	ж ж
Дни поноса у теленка	1,45	2,33	ж ж
Дозы <i>Detach</i> на теленка	2,24	-	
Дозы антибиотика на теленка	0,34	1,00	ж
Дозы электролита на теленка	0,98	3,18	-
Средний ежедневный прирост(кг-день)	0,93 <sup>I</sup>	0,97 <sup>I</sup>	-
Возраст, при котором появился первый понос у теленка (день)	10,2	0,5	-

Прим.: I Телят взвешивали лишь на двух фермах

ж  $P < 0,05$

ж ж  $P < 0,01$

